

武蔵野大学学術機関リポジトリ Musashino University Academic Institutional Repository

# 薬物の経口吸収評価を目的としたin vitro細胞透過性試験の新規モデル解析

著者	尾関 和久
学位名	博士（薬科学）
学位授与機関	武蔵野大学
学位授与年度	2015年度
学位授与番号	32680甲第25号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1419/00000226/">http://id.nii.ac.jp/1419/00000226/</a>

# 博 士 学 位 論 文

内容の要旨及び論文審査結果の要旨

第 13 号

2 0 1 6 年 3 月

武蔵野大学大学院

## は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条による公表を目的として、  
2016 年 3 月 18 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査の  
結果の要旨を収録したものである。

## 目 次

氏 名	学位記番号	学位の種類	論 文 題 目	(頁)
尾關 和久	博士甲第25号	博士（薬科学）	薬物の経口吸収評価を目的としたin vitro細胞透過性試験の新規モデル解析	・・・ 1

氏 名	尾 關 和 久
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	甲第 25 号
学位授与の日付	2016 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	薬物の経口吸収評価を目的とした in vitro 細胞透過性試験の新規 モデル解析
論 文 審 査 委 員	主 査 武蔵野大学 教授 三 原 潔 副 査 武蔵野大学 教授 伊 藤 清 美 副 査 武蔵野大学 教授 土 方 貴 雄

## 論文内容の要旨

医薬品開発において、薬物のヒトにおける経口吸収率を in vitro から予測する系として、一般的に Caco-2 細胞を用いた透過性実験が実施されている。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来の細胞株で、培養すると小腸上皮細胞に似た刷子縁やタイトジャンクションの形態学的特徴を示し、単層の細胞層を形成する。さらに薬物を細胞内から刷子縁膜側に排出する P-glycoprotein (P-gp) などのトランスポーターも発現していることが知られている。この細胞をトランスメンブレン上で培養し、刷子縁膜側 (Apical 側) に薬物を添加し、血管膜側 (Basal 側) の溶液をサンプリングすることにより、以下の式に従って見かけの透過係数 ( $P_{app}$ ) を算出する。このような実験において評価した  $P_{app}$  は、多くの薬物においてヒト経口吸収率と相関することが明らかとなっている。

$$P_{app} = \frac{1}{C_1(0) * S} \times \frac{dQ}{dt} \quad \text{式 1} \quad dQ/dt: \text{薬物の透過速度 (単位時間あたりに Basal 側に出現する薬物量)}$$

S: 細胞全体の表面積、 $C_1(0)$ : Apical 側の薬物の初濃度

式 1 は、Basal 側の薬物量は直線的に増加するという仮定に基づいている。しかし、薬物によって Apical 側に添加してから Basal 側に出現するまでに Lag time が存在したり、Basal 側の薬物濃度が直線的な増加の後、頭打ちになったりする場合がある。このようなケースでは、 $dQ/dt$  が経時的に変化し  $P_{app}$  を適切に評価できていない可能性があると考えられた。そこで本研究では、薬物の細胞透過性試験において  $P_{app}$  を適切に評価するために、細胞内分布を考慮したモデルを構築するとともに、モデル式を展開することによって、 $P_{app}$  を評価するための適切な時間範囲を明らかにした。さらに、受動拡散で膜透過する代表的な薬物および P-gp 基質を用いて Caco-2 細胞透過性試験を実施し、モデルの有用性を確認した。

## 1. 細胞内分布を考慮したモデル構築

図 1 に示す 3-コンパートメントモデルに基づいて、Apical 側、細胞内および Basal 側の薬物濃度推移をそれぞれ微分方程式で記述し、ラプラス変換を利用して解くことにより各部位の濃度推移を時間の関数として表した。

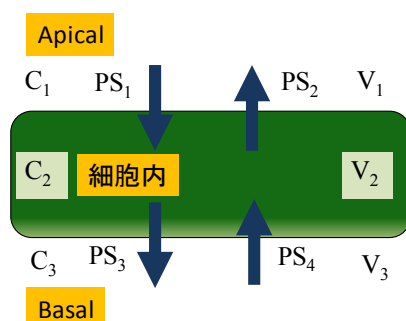


図 1 細胞内分布を考慮したモデル

$C_1$ : Apical 側の濃度,  $C_2$ : 細胞内濃度,  $C_3$ : Basal 側の濃度  
 $PS_1$ : Apical 側から細胞内への取り込みクリアランス  
 $PS_2$ : 細胞内から Apical 側への排出クリアランス  
 $PS_3$ : 細胞内から Basal 側への排出クリアランス  
 $PS_4$ : Basal 側から細胞内への取り込みクリアランス  
 $V_1$ : Apical 側の液量,  $V_2$ : 細胞内容積,  
 $V_3$ : Basal 側の液量

Apical側の濃度推移:  $C_1 = C_1(0) + A_1(1 - e^{-\alpha t}) + B_1(1 - e^{-\beta t})$  式2

細胞内の濃度推移:  $C_2 = A_2(1 - e^{-\alpha t}) + B_2(1 - e^{-\beta t})$  式3

Basal側の濃度推移:  $C_3 = A_3(1 - e^{-\alpha t}) + B_3(1 - e^{-\beta t})$  式4

$$A_1 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta-\alpha)} \left\{ \alpha^2 - \left( \frac{PS_4}{V_3} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} \right) \alpha + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right\}, \quad B_1 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha-\beta)} \left\{ \beta^2 - \left( \frac{PS_4}{V_3} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} \right) \beta + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right\},$$

$$A_2 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta-\alpha)} \times \frac{PS_1}{V_2} \times \left( -\alpha + \frac{PS_4}{V_3} \right), \quad B_2 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha-\beta)} \times \frac{PS_1}{V_2} \times \left( -\beta + \frac{PS_4}{V_3} \right), \quad A_3 = \frac{C_1(0)}{\alpha(\beta-\alpha)} \times \frac{PS_1 \times PS_3}{V_2 \times V_3},$$

$$B_3 = \frac{C_1(0)}{\beta(\alpha-\beta)} \times \frac{PS_1 \times PS_3}{V_2 \times V_3},$$

$$\alpha = \frac{1}{2} \left\{ \left( \frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right) + z \right\}, \quad \beta = \frac{1}{2} \left\{ \left( \frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right) - z \right\},$$

$$z = \left\{ \left( \frac{PS_1}{V_1} + \frac{PS_2 + PS_3}{V_2} + \frac{PS_4}{V_3} \right)^2 - 4 \left( \frac{PS_1 \times PS_3}{V_1 \times V_2} + \frac{PS_1 \times PS_4}{V_1 \times V_3} + \frac{PS_2 \times PS_4}{V_2 \times V_3} \right) \right\}^{\frac{1}{2}}$$

細胞内濃度の定常状態 ( $dC_2/dt=0$ ) および Basal 側のシンク条件 (薬物は細胞内に戻らない) を仮定し、さらに受動拡散で膜透過する薬物を想定して非結合形の膜透過クリアランスはすべて等しい ( $PS_1/Fu_1=PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_2=PS_4/Fu_3$ ;  $Fu_1$ 、 $Fu_2$ 、 $Fu_3$  はそれぞれ Apical 側、細胞内、Basal 側の非結合形分率) と仮定すると、式 1 の  $P_{app}$  は以下のように表される。

$$P_{app} = \frac{V_3}{C_1(0) \times S} \frac{dC_3}{dt} = PS_3 \times \frac{PS_1}{(PS_2 + PS_3) \times S} = \frac{PS_1}{2 \times S} \quad \text{式 5}$$

## 2. 細胞透過性試験における直線範囲について

Basal 側の薬物濃度 ( $C_3$ ) は、式 4 をテイラー展開することにより、 $3/\alpha \leq \text{時間} \leq 0.3/\beta$  の条件で  $C_3=A_3-A_3 \times \alpha t$  という直線の式に近似される (図 2)。受動拡散により膜透過する薬物を仮定してシミュレーションを行った

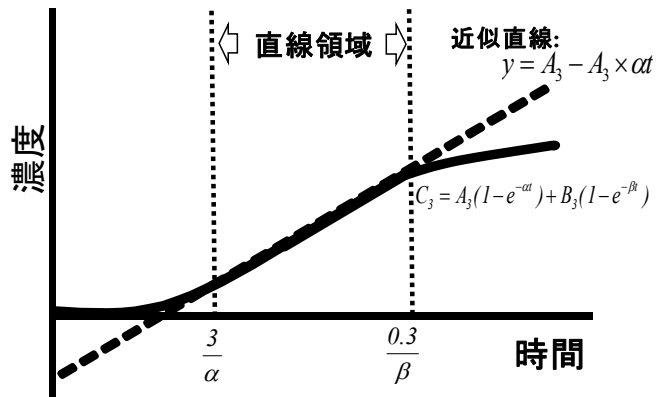


図 2 Basal 側の薬物濃度推移

結果 (図 3)、直線領域の開始時間である

$3/\alpha$  は  $P_{app}$  が大きくなるに従って小さくな

り、 $Fu_2$  が小さくなるに従って大きくなった。一方、直線領域の終了時間である  $0.3/\beta$  も

$P_{app}$  が大きくなるに従って小さくなるが、 $Fu_2$  の影響はほとんど受けなかった (図 3)。 $P_{app}$

を評価するためのシンク条件として、欧州医薬品庁の薬物相互作用に関するガイダンスでは、Apical 側の濃度に対して  $C_3$  が 10%以下であることとされているが、本結果より、 $C_3$  の直線領域はそのように一律に定義されるものではなく、薬物の膜透過性に依存することが明らかとなった。

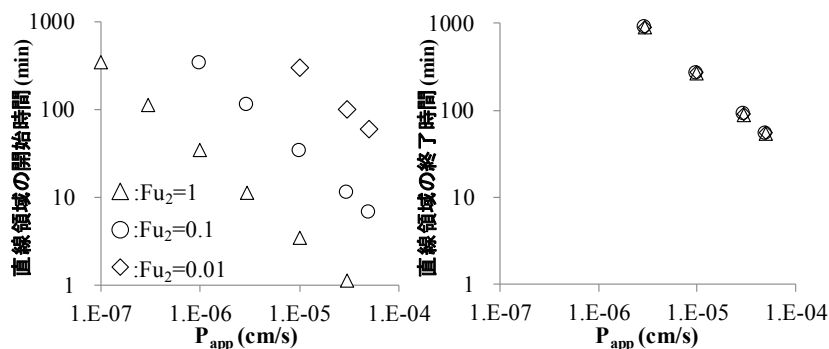


図 3 受動拡散により膜透過する薬物の Basal 側濃度推移における直線領域のシミュレーション

$PS_1/Fu_1=PS_2/Fu_2=PS_3/Fu_3=PS_4/Fu_4$  と仮定し、 $P_{app}$  は式 5 より算出した。

$V_1=250 \mu\text{L}$ 、 $V_2=0.9 \mu\text{L}$ 、 $V_3=600 \mu\text{L}$ 、 $Fu_1=Fu_3=1$

### 3. Caco-2 細胞透過性試験

#### 験

受動拡散により膜透過する代表的な薬物

(atenolol、metoprolol、propranolol) および P-gp

基質 (digoxin、

cyclosporine、

verapamil) を用いて、

Caco-2 細胞の Apical 側

に薬物を添加する透過性 (AtoB) 試験を行い、Donor (Apical) 側、細胞内、Receiver (Basal)

側の濃度推移を本モデル (式 2~4) に当てはめることにより、 $PS_1/Fu_1$  および  $Fu_2$  の最適値

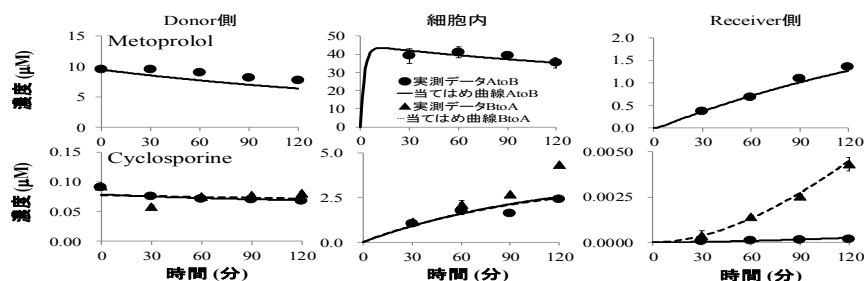


図 4 Caco-2 細胞透過性試験における薬物濃度推移

Metoprolol (10  $\mu\text{M}$ ) あるいは cyclosporine (0.1  $\mu\text{M}$ ) を Donor 側に添加した後、37°C でインキュベーションし、各時間における Donor 側、細胞内、Receiver 側の薬物濃度を放射能濃度測定によって評価した。Mean  $\pm$  SD (N=3)



を算出した。P-gp 基質については、Basal 側に薬物を添加する (BtoA) 試験も実施し、 $PS_2/Fu_2$  は独立した変数として最適化した。各薬物について最適化されたパラメータとそれらを用いて Receiver 側濃度の直線領域を算出した結果を表 1 に、代表例として metoprolol および cyclosporine の濃度推移とその当てはめ曲線を図 4 に示す。本モデルによって、いずれの濃度推移も表現することが可能であった。

Metoprolol および digoxin では算出された  $3/\alpha$  の値が小さく、薬物添加後 10 分以内に Receiver 側の直線領域が始まるのに対し、脂溶性 (cLog P) の大きい薬物では  $Fu_2$  の値が小さく、直線領域の開始時間が遅れる傾向が見られた。Cyclosporine では AtoB 試験および BtoA 試験のいずれにおいても 120 分のインキュベーション時間内に直線領域は始まらず、AtoB 試験の Receiver 側濃度推移の 120 分までの傾きから従来の方法 (式 1) により算出した  $P_{app}$  は、式 5 から算出した値と比較して 5 倍の過小評価となった。一方、metoprolol、propranolol および verapamil では 120 分のインキュベーション時間の途中で直線領域が終了することが明らかとなった。

表 1 Caco-2 細胞透過性試験解析結果

	cLog P	$Fu_2^{1)}$	$PS_1/Fu_1$ ( $\times 10^{-6}$ mL/s) <sup>1)</sup>	$PS_2/Fu_2$ ( $\times 10^{-6}$ mL/s) <sup>1)</sup>	直線領域(min) <sup>2)</sup>	
					AtoB	BtoA
Atenolol	0.22	$1.35 \pm 0.14$	$0.566 \pm 0.024$	—	29.4 - 3242	—
Metoprolol	1.95	$0.106 \pm 0.003$	$29.9 \pm 1.0$	—	7.02 - 62.4	—
Propranolol	3.48	$0.0172 \pm 0.0007$	$32.4 \pm 0.9$	—	38.1 - 71.9	—
Digoxin	1.36	$0.111 \pm 0.015$	$4.45 \pm 0.12$	$39.3 \pm 2.6$	9.26 - 1177	9.28 - 682
Cyclosporine	3.54	$0.00213 \pm 0.00053$	$6.63 \pm 0.46$	$49.3 \pm 11.9$	319 - 1724	371 - 514
Verapamil	4.33	$0.0154 \pm 0.0007$	$26.2 \pm 0.5$	$41.7 \pm 2.0$	40.5 - 106	41.6 - 126

<sup>1)</sup> 収束値 $\pm$ SD、<sup>2)</sup>  $3/\alpha < \text{時間} < 0.3/\beta$

本研究の結果より、細胞透過性試験において Basal 側濃度推移から正確な  $P_{app}$  を評価するためには、サンプリング時間を  $3/\alpha \sim 0.3/\beta$  の範囲に設定する必要があることが明らかとなった。 $\alpha$  は膜透過性と細胞内結合に、 $\beta$  は膜透過性のみに依存するパラメータであり、特に脂溶性が大きい薬物については Basal 側濃度の直線領域の開始が遅いことから、 $P_{app}$

の過小評価を避けるためには本研究で構築した 3-コンパートメントモデルに各部位の濃度推移を当てはめることが推奨される。

## 論文審査結果の要旨

医薬品開発において、薬品の経口吸収率を *in vitro* から予測することを目的として、一般的にヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞を用いた透過性試験が実施されている。細胞透過性試験では、通常、トランスメンブレン上で培養した細胞の刷子縁膜側 (Apical 側) に薬物を添加した後、血管側 (Basal 側) の薬物量が直線的に増加することを仮定して見かけの透過係数 (Papp) が評価されるが、薬物によって Basal 側濃度推移にラグタイムや頭打ちが認められ、正確な Papp を評価できない可能性が考えられた。そこで本研究では、薬物の細胞内分布を考慮したモデルを構築し、Papp を評価するための適切な時間範囲を明らかにするとともに、代表的な薬物を用いて Caco-2 細胞透過性試験を実施し、モデルの有用性を確認した。

Apical 側、細胞内、Basal 側から成る 3-コンパートメントモデルに基づいて、各部位の物質収支式から Laplas 変換を利用して解析解を導き、さらに Taylor 展開することにより、Basal 側薬物濃度推移は  $3/\alpha \leq \text{時間} \leq 0.3/\beta$  の条件で直線の式に近似されることが明らかとなった。タンパク質等に結合していない非結合形薬物のみが細胞膜を透過すると仮定してシミュレーションを実施した結果、直線領域の開始時間である  $3/\alpha$  は薬物の膜透過性と細胞内結合に依存し、終了時間である  $0.3/\beta$  は膜透過性のみに依存することが示された。6 種類の薬物を対象として Caco-2 細胞透過試験を実施し、各部位における薬物濃度推移を本モデルに当てはめることにより膜透過クリアランスおよび細胞内非結合率の最適値を求めた結果、脂溶性が大きい薬物では細胞内結合が強く、Basal 側濃度推移の直線領域の開始が遅い傾向が認められた。

本研究の結果より、薬物の細胞透過性試験において Basal 側濃度推移から正確な Papp を評価するためには、 $3/\alpha \sim 0.3/\beta$  の時間範囲で透過速度を評価する必要があることが明らかとなった。特に脂溶性が大きい薬物については、Papp の過小評価を避けるために、本研

究で構築したモデルに各部位の濃度推移を当てはめることが推奨される。医薬品候補化合物の物性が多様化している中で、製薬企業で広く実施されている細胞透過性評価方法についてモデル解析に基づき多様な化合物を想定して検証した意義は大きく、本研究は博士（薬科学）の学位に相応しいと考える。